

## PERBANDINGAN METODE ISOLASI DNA *FILTER BASED KIT*, *ALKALINE LYSIS*, DAN *HEAT TREATMENT* BERDASARKAN KUANTITAS DAN KUALITAS PADA *Candida albicans*

Aulia Mahya Faradisa, Noer Aini, Rio Risandiansyah\*  
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Prevalensi kasus kandidiasis invasif oleh *Candida albicans* (*C. albicans*) masih menjadi permasalahan yang penting. Penegakan diagnosis kandidiasis menggunakan preparat kultur membutuhkan waktu yang lama. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode diagnosis yang cepat berbasis *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Metode isolasi DNA yang umum digunakan adalah *Filter Based Kit* (FBK), namun, terdapat metode lebih sederhana yaitu *Alkaline Lysis* (AL) dan *Heat Treatment* (HT). Penelitian ini bertujuan mengetahui perbandingan kuantitas dan kualitas isolasi DNA *C. albicans* dengan menggunakan metode AL dan HT dibandingkan dengan FBK.

**Metode:** Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium *in vitro*. Kuantifikasi *C. albicans* dilakukan dengan *haemocytometer* dan didapatkan jumlah stok sampel  $10^9$  sel/mL. Metode FBK, AL, dan HT dilakukan pada konsentrasi  $10^8$ ,  $10^9$  sel/mL dan *normal saline* (NS). Perhitungan kuantitas dan kualitas DNA dilakukan menggunakan Spektrofotometer NanoDrop. Analisa statistik menggunakan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dan *Least Significant Difference* (LSD) pada SPSS versi 22.0.

**Hasil dan Pembahasan:** Hasil kuantitas DNA *C. albicans* pada konsentrasi  $10^9$  sel/mL terhadap kontrol pada metode FBK, AL, HT yaitu  $61,60 \pm 3,78$ ,  $8,20 \pm 1,92$ ,  $165 \pm 1,58$ , dan berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ). Sedangkan pada konsentrasi *C. albicans*  $10^8$  sel/mL terhadap kontrol, kuantitas DNA metode FBK, AL, HT yaitu  $2,60 \pm 0,54$ ,  $3,40 \pm 1,14$ , dan  $36,8 \pm 5$   $\mu\text{g/mL}$ , dan berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ). Kualitas DNA ( $A_{260}/A_{280}$ ) konsentrasi *C. albicans*  $10^9$  sel/mL terhadap kontrol pada metode FBK, AL, HT  $1,87 \pm 0,05$ ,  $0 \pm 0$ , dan  $1,35 \pm 0,05$  dan berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ). Demikian pula pada konsentrasi DNA *C. albicans*  $10^8$  sel/mL  $2,10 \pm 0,54$ ,  $0 \pm 0$ , dan  $1,80 \pm 0,54$   $\mu\text{g/mL}$ .

**Kesimpulan:** Isolasi DNA *C. albicans* metode HT menghasilkan kuantitas dan kualitas DNA yang lebih baik bila dibandingkan metode FBK dan AL.

**Kata Kunci:** Isolasi DNA; *Polymerase Chain Reaction*; diagnosis.

## COMPARISON OF DNA *FILTER BASED KIT*, *ALKALINE LYSIS*, AND *HEAT TREATMENT* ISOLATION METHODS BASED ON QUANTITY AND QUALITY IN *Candida albicans*

Aulia Mahya Faradisa, Noer Aini, Rio Risandiansyah\*  
Faculty of Medicine, University of Islam Malang

### ABSTRACT

**Introduction:** The prevalence of invasive candidiasis caused by *Candida albicans* (*C. albicans*) is still a problem. Diagnosis of candidiasis using culture requires a long time. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) is a rapid diagnosis based on *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Commonly, the DNA isolation method is *Filter Based Kit* (FBK), but there are simpler methods including *alkaline lysis* (AL) and *heat treatment* (HT). This study aims to compare the quantity and quality of *C. albicans* DNA using AL and HT compared with the FBK method.

**Methods:** This research is an *in vitro* laboratory experiment. Quantification of *C. albicans* was done using *haemocytometer* where a stock sample of  $10^9$  cells/mL was obtained. The FBK, AL, and HT methods were carried out at the concentrations of  $10^8$ ,  $10^9$  cells/mL and each of method was compared with *normal saline* (NS). Calculation of the quantity and quality of DNA were conducted using a *NanoDrop Spectrophotometer*. Data were analysed using *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) and followed by *least significant difference* (LSD) on SPSS version 22.0. it considered significant at  $p < 0.05$ .

**Results and Discussion:** The quantity of *C. albicans* DNA at  $10^9$  cells/mL compared to control on FBK, AL, HT methods were  $61.60 \pm 3.78$ ,  $8.20 \pm 1.92$ , and  $165 \pm 1.58$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and significantly different ( $p < 0.05$ ). The quantity of *C. albicans* DNA at stock sample of  $10^8$  cells/mL compared to control on FBK, AL, HT methods were  $2.60 \pm 0.54$ ,  $3.40 \pm 1.14$ , and  $36.8 \pm 5.26$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and significantly different ( $p < 0.05$ ). The quality of DNA ( $A_{260}/A_{280}$ ) at  $10^9$  cells/mL were  $1.87 \pm 0.05$ ,  $0 \pm 0$ , and  $1.35 \pm 0.05$ , and at  $10^8$  cells/mL were  $2, 10 \pm 0.54, 0 \pm 0$ , and  $1.80 \pm 0.54$ . All groups were significant both at  $10^9$  cells/mL and  $10^8$  cells/mL ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** HT method provided better quantity and quality *C. albicans* DNA isolation in comparison with FBK and AL methods.

**Keywords:** DNA Isolation; *Polymerase Chain Reaction*; diagnosis.

\*Corresponding author:

Rio Risandiansyah, S.Ked, M.P, Ph.D  
Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144  
Telp +62(341)578920  
e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id.

## PENDAHULUAN

Prevalensi kasus infeksi jamur yang disebabkan oleh *C. albicans* masih menjadi penyebab mortalitas dan morbiditas terutama pada pasien kandidiasis invasif.<sup>1,2,3</sup> Peningkatan jumlah kematian tiap tahun pada pasien kandidiasis invasif membutuhkan diagnosis cepat untuk penegakan diagnosa. *Gold standard* untuk penegakan diagnosa *candidiasis* adalah dengan pemeriksaan kultur jamur dan histopatologi.<sup>4</sup> Metode kultur membutuhkan waktu 2 - 5 hari kerja untuk mencapai hasil yang akurat dan kurang sensitif sehingga dibutuhkan diagnosis cepat dan tepat.<sup>5</sup>

Salah satu metode diagnosis cepat yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang baik adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode ini sudah banyak digunakan untuk deteksi infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, baik bakteri, virus maupun jamur. PCR dalam mendeteksi infeksi jamur memiliki sensitivitas dan spesifisitas kurang lebih 85%.<sup>5</sup> Deteksi dengan PCR membutuhkan sampel DNA yang baik melalui proses isolasi DNA.<sup>6</sup>

Metode isolasi DNA sudah mengalami banyak perkembangan.<sup>7</sup> Salah satunya adalah metode *filter based kit*, merupakan metode yang umum digunakan untuk mengisolasi DNA. Metode ini sudah banyak digunakan karena cepat dan cukup mudah digunakan sebab dalam bentuk kit komersial.<sup>8</sup> Kekurangan dari metode ini adalah alat yang digunakan tidak bisa didapatkan dengan mudah dan harganya yang relatif mahal.<sup>9</sup> Maka dari itu dibutuhkan metode yang lebih sederhana yang menghasilkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik yaitu *alkaline lysis* dan *heat treatment*. Metode tersebut memiliki prinsip yang sederhana sehingga lebih efektif dan efisien baik dari segi biaya maupun waktu. Metode *alkaline lysis* dan *heat treatment* memiliki kelebihan yaitu bahan yang digunakan tidak beracun, prosedurnya sederhana, biayanya murah, membutuhkan persiapan yang mudah dan cepat, serta menghasilkan kemurnian yang bagus.<sup>10,11,12</sup>

Uji isolasi DNA dengan parameter *yield* dan kemurnian menggunakan metode *filter based kit*, *alkaline lysis* dan *heat treatment* belum pernah dilakukan. Penelitian ini akan melakukan uji perbandingan *yield* dan kemurnian dari DNA *C. albicans* dengan menggunakan metode isolasi DNA *alkaline lysis* dan *heat treatment* dibandingkan dengan metode *filter based kit*.

## METODE PENELITIAN

### Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *in vitro* dengan membandingkan metode *filter based kit*, *alkaline lysis*, dan *heat treatment* yang tujuannya untuk mengetahui dari kuantitas dan kualitas DNA *C. albicans*. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juli - Agustus 2021 yang

dilakukan Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

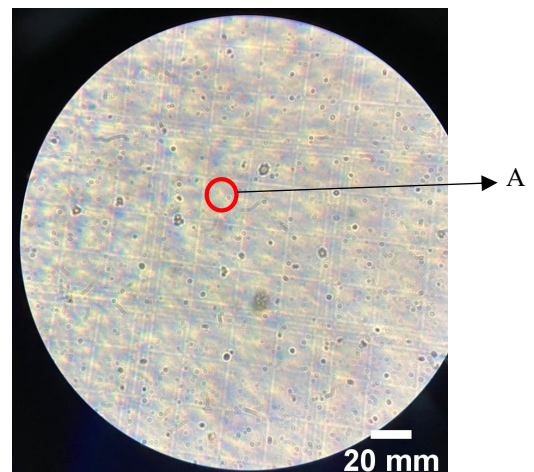
### Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel jamur *C. albicans* kami dapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang (FK UMM) dan telah dideterminasi disana kemudian Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA).

### Perhitungan Konsentrasi Jamur *C. albicans*

Penghitungan langsung dengan menggunakan *haemocytometer* dilakukan dengan tahapan yaitu sampel jamur *C. albicans* dipanen dari cawan petri dimasukkan ke dalam media cair *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) kemudian dicampurkan dan divortex hingga menjadi suspensi.<sup>13</sup> Setelah itu, suspensi diteteskan pada *haemocytometer* lalu diamati dibawah mikroskop binokuler pada perbesaran 400 kali. Jumlah sel jamur tiap mL dapat ditentukan dengan cara menentukan jumlah dari sel rata-rata pada tiap petak yang volumenya telah diketahui.<sup>14</sup> Hasil pengamatan pada mikroskop dengan menggunakan *haemocytometer* pada gambar 1. dihitung dengan rumus:

Jumlah sel  $\left(\frac{\text{sel}}{\text{mL}}\right) = \text{rata-rata 16 kotak yang dihitung} \times 0.2 \times 0.2 \times 0.2 \times 0.1 \times \text{faktor dilusi (rumus 1)}.$ <sup>14</sup>



**Gambar 1. Hasil pengamatan *C. albicans***

**Keterangan:** Pada gambar 1. terdapat hasil pengamatan langsung pada mikroskop menggunakan *haemocytometer* dengan perbesaran 400x. Notasi (A): sel jamur *C. albicans* terlihat sel yeast berbentuk bulat dengan tepi garis berwarna hitam

### Isolasi DNA Menggunakan Metode *Filter Based Kit*

Isolasi DNA dilakukan menggunakan Wizard® SV Genomic DNA *purification kit*, dan dilakukan sesuai instruksi dari produsen.<sup>15</sup> Masing-masing konsentrasi jamur yang ingin diuji, dipindahkan 1 ml suspensi jamur *Candida albicans*

ke dalam *microtube* 1,5 ml. Pada *microtube* tersebut ditambahkan 150 µl Wizard® SV *Lysis buffer* dan dicampurkan dengan pipet. Pada setiap sampel, lisat dipindahkan ke dalam kolom Mini Wizard® SV dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 × g selama 3 menit, dan cairan di *collection tube* dibuang dan *collection tube* disusun ulang di rangkaian kolom. Pada rangkaian tersebut ditambahkan 650 µl *Column Wash Solution* dan juga ditambahkan 95% etanol kemudian disentrifugasi pada 13.000 × g selama 1 menit lalu cairan dibuang dari *collection tube*. Ulangi langkah ini untuk total 4 kali pencucian. Setelah itu, rangkaian disentrifugasi selama 2 menit pada 13.000 × g untuk mengeringkan binding matrix. Wizard® SV Minicolumn dipindahkan ke tabung 1.5 ml baru, kemudian ditambahkan *Nuclease-Free Water* 250 µl pada suhu kamar, lalu diinkubasi selama 2 menit pada suhu kamar. Selanjutnya disentrifugasi *unit minicolumn / elution tube* pada 13.000 × g selama 1 menit. Volume elusi total akan menjadi 250 µl. Setelah itu lepaskan kolom mini dan simpan DNA yang telah dimurnikan pada suhu -20 hingga -70 °C.

#### **Isolasi DNA Menggunakan Metode *Alkaline Lysis Method***

Isolasi DNA menggunakan metode *alkaline lysis* berdasarkan Mulhardt dan Beese (2007). Masing - masing konsentrasi jamur yang ingin diuji, dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 ml kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 g selama 2 menit hingga terbentuk pelet, dan supernatan dibuang. Pelet yang berasal dari 1,5 ml jamur disuspensi kembali dalam 150 µL larutan I (glukosa 50 mM / 25mM Tris / 10mM EDTA), lalu ditambahkan 150 µL larutan II (0,2 N NaOH / 1% SDS [w / v]). Kemudian sampel dicampur secara menyeluruh dan diinkubasi selama 30 detik sampai larut. Setelah itu ditambahkan 150 µL larutan III (3 M kalium asetat, pH 5,2) dan kemudian dicampurkan. Selanjutnya dua tetes kloroform ditambahkan dan Larutan ini dicampur dan disentrifugasi selama 2 sampai 5 menit pada suhu kamar. Supernatan bening (kira-kira 400 µL) dituangkan ke dalam *microtube* yang baru lalu ditambahkan 1 mL etanol, dan larutan dicampur dan disentrifugasi pada kecepatan 15.000 g selama 10 sampai 15 menit pada suhu 4 °C. Kemudian pelet dikeringkan dan dilarutkan dalam 50 sampai 100 µL TE ditambah 1 sampai 2 µL RNase A bebas DNase (10mg / mL).

#### **Isolasi DNA Menggunakan Metode *Heat Treatment***

Isolasi DNA dengan menggunakan metode *heat treatment* berdasarkan Omar dan Anas (2017). Masing - masing konsentrasi jamur yang ingin diuji, dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 ml. Selanjutnya, *microtube* 1.5 ml tersebut disentrifugasi pada 15.000 × g selama 10 menit. Pelet disuspensi kembali dalam 40 µl air, dididihkan pada suhu 100 °C dalam penangas air selama 10 menit. Sampel kemudian didinginkan di atas es lalu disentrifugasi 15.000 × g

selama 10 detik, dan disimpan pada suhu -20 °C. Selanjutnya, *C. albicans* ditambahkan larutan DNA TE sebanyak 50 µL dan dilakukan untuk pengukuran *yield* dan kemurnian.

#### **Pengukuran *Yield* dan Kemurnian**

Pengukuran konsentrasi DNA total pada metode *filter based kit*, *alkaline lysis* dan *heat treatment* lalu diukur dengan meneteskan sebanyak 1 - 2 µL suspensi ke atas UV-Vis, absorbansi dilakukan pada  $\lambda = 230, 260$ , dan 280 nm menggunakan Spektrofotometer NanoDrop (BioDrop) yang dilakukan pengulangan 3 kali. Nilai *yield* baik jika terdapat perbedaan signifikan dengan kontrol sedangkan untuk kemurnian dikatakan baik jika nilainya 1,8 - 2,0.<sup>15</sup>

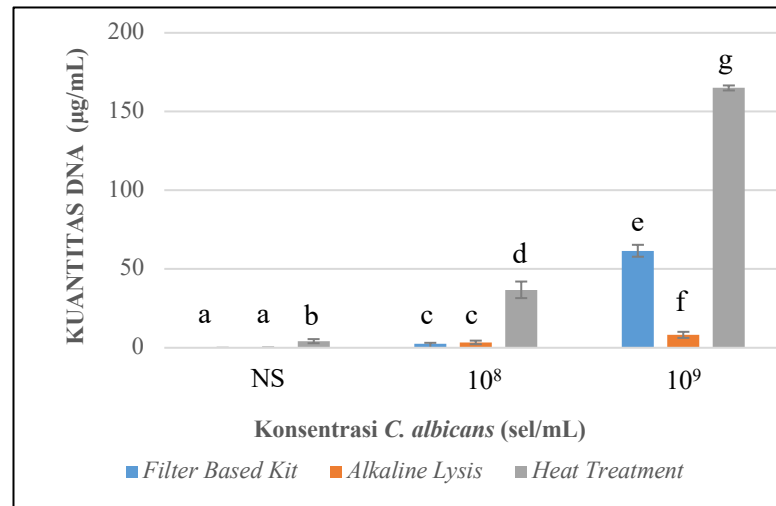
#### **Analisa Data**

Pengujian hipotesis dilakukan pada data yang diperoleh lalu diuji normalitas dan homogenitasnya apabila didapatkan  $p > 0,05$  maka dilanjutkan dengan uji menggunakan metode *One Way Analysis Of Variance* (ANOVA) dan uji *Least Significant Difference* (LSD) guna mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan. Uji analisa statistik dilakukan menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) version 22.0.

### **HASIL PENELITIAN**

#### **Hasil Perbandingan Kuantitas dan Kualitas. DNA Metode *Filter Based Kit*, *Alkaline Lysis* dan *Heat Treatment* pada Konsentrasi sampel *C. albicans* yang sama**

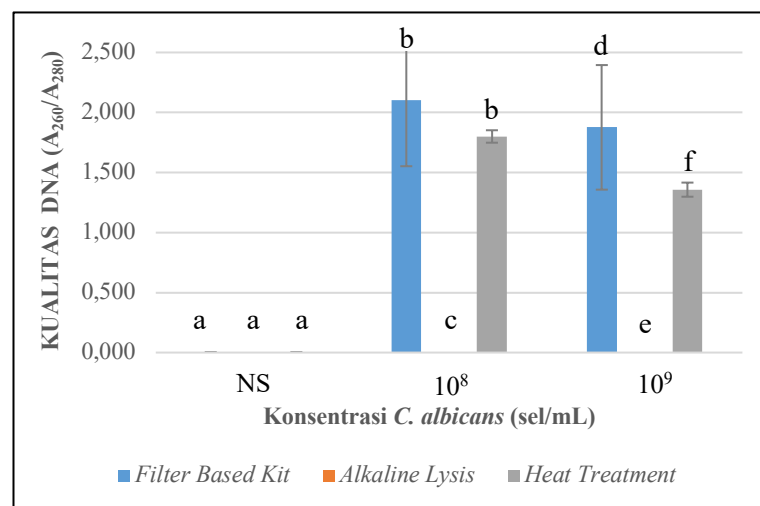
Isolat DNA *C. albicans* yang didapatkan melalui metode FBK, AL dan HT selanjutnya dilakukan uji untuk mengetahui nilai *yield* dan kemurnian DNA dengan cara diteteskan pada Spektrofotometer NanoDrop. Berikut untuk perbandingan antar metode pada konsentrasi yang sama ditunjukkan pada gambar 2.



**Gambar 2. Histogram Perbandingan Kuantitas DNA *C. albicans* pada Metode *Filter Based Kit*, *Alkaline Lysis*, dan *Heat Treatment*.**

**Keterangan:** Gambar 2 menunjukkan hasil kuantitas DNA dalam mean  $\pm$  standar deviasi,  $n = 5$ . Kuantitas DNA pada kontrol NS untuk metode FBK ( $0 \pm 0$  µg/mL), konsentrasi  $10^8$  sel/mL ( $2,60 \pm 0,54$  µg/mL), konsentrasi  $10^9$  sel/mL ( $61,60 \pm 3,78$  µg/mL). Kuantitas DNA kontrol NS metode AL ( $0 \pm 0$  µg/mL), konsentrasi  $10^8$  sel/mL ( $3,40 \pm 1$  µg/mL), konsentrasi  $10^9$  sel/mL ( $8,20 \pm 1,92$  µg/mL). Kuantitas DNA metode HT pada kontrol NS ( $4,20 \pm 1,30$  µg/mL), konsentrasi  $10^8$  sel/mL ( $36,8 \pm 5,26$  µg/mL), konsentrasi  $10^9$  sel/mL ( $165 \pm 1,58$  µg/mL). Selanjutnya, dilakukan uji statistik menggunakan *One Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ). Pada notasi (a dan b) : bermakna kuantitas DNA berbeda signifikan, notasi (c dan d): bermakna kuantitas DNA berbeda signifikan, notasi (e, f, dan g) bermakna kuantitas DNA berbeda signifikan.

Gambar 2. Hasil uji statistik kuantitas DNA pada kontrol NS dan konsentrasi  $10^8$  sel/mL metode *heat treatment* berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) jika dibandingkan dengan metode *filter based kit* dan *alkaline lysis*. Hasil *yield* DNA terendah terdapat pada metode *alkaline lysis*. Kuantitas DNA konsentrasi  $10^9$  sel/mL bermakna berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) pada setiap metode.



**Gambar 3. Histogram Perbandingan Kualitas DNA *C. albicans* pada Metode *Filter Based Kit*, *Alkaline Lysis*, dan *Heat Treatment*.**

**Keterangan:** Gambar 3 menunjukkan hasil kualitas DNA dalam mean  $\pm$  standar deviasi,  $n = 5$ . Kualitas DNA pada metode FBK untuk kontrol NS ( $0 \pm 0$ ), konsentrasi  $10^8$  sel/mL ( $2,10 \pm 0,54$ ), konsentrasi  $10^9$  sel/mL ( $1,87 \pm 0,05$ ). Kualitas DNA untuk metode AL pada kontrol NS, konsentrasi  $10^8$  sel/mL, dan  $10^9$  sel/mL yaitu ( $0 \pm 0$ ). Kualitas DNA metode HT pada kontrol NS ( $0 \pm 0$ ), konsentrasi  $10^8$  sel/mL ( $1,80 \pm 0,54$ ), konsentrasi  $10^9$  sel/mL ( $1,35 \pm 0,05$ ). Data dilakukan uji statistik menggunakan *One Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ). Pada notasi (a): tidak ada beda signifikan, notasi (b dan c): bermakna kuantitas DNA berbeda signifikan, notasi (d, e, dan f) bermakna kuantitas DNA berbeda signifikan..

Gambar 3. Hasil uji statistik kualitas DNA pada kontrol NS tidak berbeda signifikan ( $p > 0.05$ ) pada setiap metode. Kualitas DNA pada konsentrasi  $10^8$  sel/mL pada metode *heat treatment* dan *filter based kit* bermakna berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) dibandingkan dengan metode *alkaline lysis*. Kualitas DNA pada konsentrasi  $10^9$  sel/mL bermakna berbeda signifikan ( $p > 0.05$ ) pada setiap metode isolasi DNA.

## PEMBAHASAN

### Perbandingan Kuantitas DNA Terhadap Metode Isolasi DNA

Keberhasilan suatu metode isolasi DNA dipengaruhi oleh kuantitas dan kualitas dari DNA jamur *C. albicans*. Hasil kuantitas DNA diperoleh dari *yield* dan kualitas DNA dari kemurnian yang diuji pada Spektrofotometer NanoDrop. Penelitian ini dilakukan perbandingan *yield* antara metode *alkaline lysis*, *heat treatment* dengan *filter based kit*. Nilai *yield* DNA bisa dikatakan tinggi apabila hasilnya lebih dari 10 µg/mL.<sup>16</sup> Pada penelitian ini didapatkan hasil kuantitas DNA metode *heat treatment* untuk semua konsentrasi lebih tinggi dibandingkan dengan metode *filter based kit* dan *alkaline lysis*.

Beberapa faktor yang mempengaruhi kuantitas DNA adalah jumlah sel yang lebih sedikit pada sampel, proses pembuatan suspensi dan pengambilan sampel.<sup>17</sup> Jumlah sel yang lebih sedikit tergantung pada struktur dinding sel yang melindungi jamur. Diketahui bahwa dinding sel jamur terdiri dari chitin, mannoprotein, β-glucan, β-glucan chitin, dan membran plasma. Untuk mendapatkan jumlah sel DNA yang lebih sulit dibandingkan DNA bakteri atau sel mamalia karena dinding sel jamur yang tebal dan kompleks sehingga sulit untuk dilisiskan.<sup>18,19</sup> Faktor pembuatan suspensi sampel jamur yang tidak sempurna akan mempengaruhi jumlah sel yang diisolasi.<sup>17</sup>

Hasil kuantitas DNA metode *heat treatment* pada konsentrasi 10<sup>8</sup> dan 10<sup>9</sup> sel/mL berbeda signifikan dengan *filter based kit* dan *alkaline lysis*. Metode ini tidak memerlukan alat seperti kit atau reagen khusus sehingga lebih murah jika dibandingkan dengan metode *filter based kit*.<sup>7,20</sup> Hasil penelitian pada metode *heat treatment* untuk konsentrasi 10<sup>8</sup> sel/mL (36,8 µg/mL) dan 10<sup>9</sup> sel/mL (165 µg/mL) termasuk kuantitas DNA yang baik. Hal ini sesuai dengan teori pada pemanasan suhu 42 °C dalam waktu 1 jam mampu melisiskan dinding sel jamur dengan sempurna,<sup>21,22</sup> sehingga diduga pada pemanasan 100 °C selama 10 menit dapat melisiskan dinding sel *Candida albicans*. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Silva *et al* (2012), pada sel jamur *Saccharomyces cerevisiae* konsentrasi 10<sup>7</sup> sel/mL didapatkan hasil kuantitas DNA yang baik dan lebih menguntungkan untuk amplifikasi PCR.<sup>23</sup> Pada pohon penelitian yang sama juga didapatkan hasil kuantitas DNA *A. niger* metode *heat treatment* konsentrasi 10<sup>4</sup> sel/mL (12,8 µg/mL) dan 10<sup>9</sup> sel/mL (194,8 µg/mL) dikategorikan memiliki kuantitas DNA yang baik (>10 µg/mL).

Hasil penelitian kuantitas DNA metode *filter based kit* pada konsentrasi 10<sup>8</sup> sel/mL (2,60 µg/mL) dan 10<sup>9</sup> sel/mL (61,60 µg/mL). Pada konsentrasi 10<sup>9</sup> sel/mL termasuk kategori kuantitas DNA yang baik, tetapi konsentrasi 10<sup>8</sup> sel/mL didapatkan kategori yang rendah. Hal ini diduga karena pada konsentrasi 10<sup>8</sup> sel/mL (<10<sup>9</sup> sel/mL) jumlah sel tidak cukup banyak untuk dapat dilisiskan oleh *lysis buffer* dari *filter based kit*.<sup>24</sup> Faktor lain yang mempengaruhi

kuantitas DNA penelitian ini adalah tidak menggunakan enzim proteinase K untuk pelisisan dinding sel jamur, sehingga mempengaruhi hasil kualitas isolat DNA karena enzim ini memiliki fungsi untuk mendegradasi suatu protein yang dapat menyebabkan kerusakan DNA dan aktifitas dari enzim tersebut menyebabkan jumlah kualitas DNA yang rendah.<sup>25,26,27</sup> Pada penelitian sebelumnya metode *filter based kit* didapatkan hasil kuantitas DNA untuk *S. aureus* konsentrasi 10<sup>4</sup> CFU/mL (5 µg/mL) dan oleh rekan pohon penelitian yang sama juga didapatkan hasil kuantitas DNA *A. niger* konsentrasi 10<sup>4</sup> sel/mL (2,8 µg/mL).<sup>27</sup>

Metode *alkaline lysis* merupakan metode isolasi DNA yang memiliki proses sederhana, mudah dan murah untuk digunakan dibandingkan metode *filter based kit*.<sup>28</sup> Hasil penelitian pada konsentrasi 10<sup>8</sup> sel/mL (3,40 µg/mL) dan 10<sup>9</sup> sel/mL (8,20 µg/mL) dikategorikan kuantitas DNA rendah. Hal ini diduga disebabkan oleh larutan basa NaOH (*Natrium Hidroksida*) pada konsentrasi 0,2 N tidak dapat melisiskan dinding sel jamur dengan sempurna sehingga kuantitas DNA yang dihasilkan rendah.<sup>29</sup> Pada penelitian sebelumnya menggunakan metode modifikasi *alkaline lysis* (NaOH 1,5 - 2 N) didapatkan hasil kuantitas DNA yang tinggi.<sup>30</sup> Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Rodriguez *et al* (2017) pada sel jamur *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan NaOH 0,2 - 0,3 N didapatkan hasil kuantitas DNA yang rendah.<sup>30,28</sup> Pada pohon penelitian yang sama juga didapatkan hasil kuantitas DNA *A. niger* yang rendah pada konsentrasi 10<sup>4</sup> sel/mL (1,8 µg/mL).

Kuantitas DNA *Candida albicans* memiliki batas minimum dapat dikatakan baik dan dapat digunakan untuk tahapan pemeriksaan lebih lanjut yaitu PCR atau *sequencing* DNA pada konsentrasi 10<sup>9</sup> sel/mL. *Infective dose* adalah jumlah sel suatu patogen dapat menginfeksi inang, pada *Candida albicans* dapat menginfeksi manusia membutuhkan antara 10<sup>3</sup> - 10<sup>8</sup> CFU/mL.<sup>31,28</sup>

### Perbandingan Kualitas DNA Terhadap Metode Isolasi DNA

Deteksi jamur dalam sampel dengan PCR tidak hanya tergantung pada kinerja dari PCR itu sendiri, tetapi juga pada efisiensi dari prosedur kerja metode isolasi DNA. Keberhasilan PCR sangat dipengaruhi oleh beberapa parameter yaitu komposisi penyangga dan stabilitas, konsentrasi dNTPs, parameter siklus, karakteristik sampel awal, dan kualitas DNA pada sampel.<sup>32</sup> Nilai untuk kualitas DNA dikatakan mempunyai kemurnian yang baik dengan rasio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> yaitu 1,8 - 2,0. Hasil penelitian ini didapatkan kualitas DNA pada konsentrasi 10<sup>9</sup> sel/mL metode *filter based kit* lebih baik dibandingkan *alkaline lysis* dan *heat treatment*. Kualitas DNA pada konsentrasi 10<sup>8</sup> sel/mL pada metode *heat treatment* dan *filter based kit* lebih baik dibandingkan metode *alkaline lysis*.

Hasil penelitian kualitas DNA pada

konsentrasi  $10^8$  sel/mL (1,80) didapatkan hasil dalam kategori baik pada *heat treatment* dan *filter based kit* dibandingkan *alkaline lysis* ( $p < 0.05$ ). Kualitas DNA dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu pada proses pelisisan dinding sel yang tidak sempurna dan proses presipitasi yang kurang maksimal. Hal ini diduga karena pada dinding sel jamur yang kompleks sulit untuk dilakukan proses pelisisan sehingga kualitas DNA yang didapatkan rendah. Pada presipitasi DNA yang kurang maksimal juga dapat mempengaruhi hasil kualitas DNA yang menyebabkan adanya kontaminan protein maupun RNA pada proses isolasi DNA.<sup>22</sup>

Hasil kualitas DNA pada metode *heat treatment* untuk konsentrasi  $10^9$  sel/mL (1,35) menunjukkan kualitas DNA yang kurang baik, akan tetapi pada konsentrasi  $10^8$  sel/mL (1,80) didapatkan kualitas DNA yang baik. Kualitas DNA yang kurang dari 1,8 menunjukkan bahwa adanya kontaminan protein. Hal ini diduga karena tidak adanya tahapan presipitasi (penyaringan komponen non-DNA) dan purifikasi (pemurnian DNA) pada metode *heat treatment*, sehingga dapat menyebabkan tingginya tingkat kontaminasi.<sup>33</sup> Hasil pada penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Griffiths *et al* (2006), pada sel jamur *A. fumigatus* konsentrasi  $10^7$  CFU/mL didapatkan kualitas DNA yang jelek sehingga tidak dapat dilakukan amplifikasi PCR.<sup>34</sup> Hasil pohon penelitian yang sama pada DNA *A. niger* pada konsentrasi  $10^9$  sel/mL didapatkan kualitas DNA 1,26 yang termasuk kategori kualitas DNA yang jelek.

Kualitas DNA pada metode *filter based kit* untuk konsentrasi  $10^8$  sel/mL (2,10) termasuk konsentrasi DNA yang kurang baik, sedangkan konsentrasi  $10^9$  sel/mL (1,87) termasuk kualitas DNA yang baik.<sup>21</sup> Hal ini diduga disebabkan pada penelitian ini tidak menggunakan enzim proteinase K yang berfungsi mendegradasi protein, sehingga jumlah kontaminan protein meningkat dan kualitas DNA yang diperoleh semakin rendah.<sup>27,25</sup> Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Kumalasari (2020), pada sel *S. aureus* konsentrasi  $10^4$  CFU/mL dan didapatkan kualitas DNA yang jelek.<sup>27</sup>

Kualitas DNA pada konsentrasi  $10^8$  sel/mL dan  $10^9$  sel/mL menggunakan metode *alkaline lysis* tidak dapat diidentifikasi karena hasil keduanya nol, hal ini diduga disebabkan oleh beberapa faktor yaitu adanya kontaminan protein maupun RNA<sup>17</sup> dan kadar

konsentrasi Natrium Hidroksida (NaOH) 0,2N tidak mampu mendenaturasi protein.<sup>35</sup> Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Rodriguez *et al* (2017) pada sel jamur *Saccharomyces cerevisiae*, penggunaan isopropanol atau kalium asetat tidak dapat menghasilkan DNA yang murni, sehingga dapat mempengaruhi hasil kualitas DNA yang jelek.<sup>30,28</sup>

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, analisis data dan pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Metode *heat treatment* menghasilkan kuantitas yang tinggi dan kualitas DNA *Candida albicans* yang baik pada konsentrasi  $10^8$  sel/mL dibandingkan dengan metode *filter based kit* dan *alkaline lysis*.
2. Metode *filter based kit* menghasilkan kuantitas DNA yang tinggi dan kualitas DNA *Candida albicans* yang baik pada konsentrasi  $10^9$  sel/mL dibandingkan metode *heat treatment* dan *alkaline lysis*.

## SARAN

Berdasarkan penelitian ini, maka saran peneliti untuk perbaikan penelitian selanjutnya:

1. Membandingkan metode isolasi DNA pada dosis infeksi untuk beberapa jenis penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans*, yaitu pada  $10^3$  hingga  $10^6$  CFU/ml.
2. Melakukan penelitian lanjutan seperti uji PCR pada hasil isolat DNA yang didapatkan sehingga hasilnya dapat terkonfirmasi secara aplikatif.
3. Melakukan modifikasi metode *alkaline lysis* dengan meningkatkan konsentrasi NaOH (1,5 - 2N) untuk mendapatkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik.
4. Melakukan modifikasi metode *heat treatment* dengan menambahkan tahapan presipitasi dan purifikasi.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada IOM FK UNISMA yang mendanai penelitian ini, tim kelompok penelitian yang telah membantu proses penelitian ini, dan dr. Hj. Erna Sulistyowati, M.Kes, Ph.D sebagai *peer reviewer*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Wahyuningsih R, Adawiyah R, Rozaliyani A, Denning DW, Prihartono J, Syam R, et al. Estimation of the serious mycoses burden in Indonesia. **27th Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis 2017**. 2017;(April):1454.
2. Puspitasari A, Kawilarang AP, Ervianti E, Rohiman A. Profil Pasien Baru Kandidiasis (Profile of New Patients of Candidiasis). **Berk Ilmu Kesehat Kulit dan Kelamin**. 2019;31(1):24–34.
3. Arastehfar A, Carvalho A, Hong Nguyen M, Hedayati MT, Netea MG, Perlman DS, et al. Covid-19-associated candidiasis (Cac): An underestimated complication in the absence of immunological predispositions? **J Fungi**. 2020;6(4):1–13.
4. Pitarch A, Nombela C, Gil C. Diagnosis of Invasive Candidiasis: From Gold Standard

- Methods to Promising Leading-edge Technologies. **Curr Top Med Chem.** 2018;18(16):1375–92.
5. Sidharta BRA, Suparyatmo J, Astuti AF. C-Reactive Protein as A Fungal Infection Marker in Acute Leukemia Patients. **Indones J Clin Pathol Med Lab.** 2021;27(2):212.
  6. Muna F, Fitri N, Malik A, Karuniawati A, Amin Soebandrio dan. Metode Cepat Ekstraksi DNA Corynebacterium diphtheriae Untuk Pemeriksaan PCR Quick Method To Extract Corynebacterium Diphtheriae DNA For PCR Examination. **Bul Penelit Kesehat.** 2014;42(2):85–92.
  7. Sundari. Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Cengkeh dengan Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB DNA Isolation Technique of Clove Plant Genomes Using Buffer CTAB Modification. **Biol J Edisi, Edukasi.** 2018;10:21–6.
  8. Gardenia L, Koesharyani I. Metode Isolasi Deoxyribo Nucleic Acid Bakteri Dari Organ Ikan Nila ( *Oreochromis niloticus* ) Untuk Diagnosa Streptococciosis Dengan Teknik Polymerase Chain Reaction. **J Ris Akuakultur.** 2011;6(3):469.
  9. Barbosa C, Nogueira S, Gadanho M, Chaves S. DNA extraction: Finding the most suitable method. *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries.* Elsevier Inc.; 2016. 135–154 p.
  10. Mutia S, Fauziah, Zairin, Thomy. Jurnal bioleuser. **J Bioleuser.** 2018;2(2):29–35.
  11. Yahya A, Firmansyah M, Arlisyah A, Risandiansyah R. Comparison of DNA Extraction Methods Between Conventional, Kit, Alkali and Buffer-Only for PCR Amplification on Raw and Boiled Bovine and Porcine Meat. **J Exp Life Sci.** 2017;7(2):110–4.
  12. Mulhardt C & B. *Molecular Biology and Genomics.* 2007. 55–57 p.
  13. Warsinah, Kusumawati E, Sunarno. Identifikasi Senyawa Antifungi Dari Kulit Batang Kecapi ( *Sandoricum koetjape* ) Dan Aktivitasnya Terhadap *Candida albicans*. 2011;16(3):170–8.
  14. Wijaya RC, E.L.Utari, Yudianingsih. Perancangan Alat Penghitung Bakteri. **J Teknol Inf.** 2015;10(29):1–8.
  15. Promega C. Wizard® SV Genomic DNA Purification System. Components. 2010. p. 1123–6.
  16. Ahmed OB, Dablood AS. Quality Improvement of the DNA extracted by boiling method in Gram negative bacteria. **Int J Bioassays.** 2017;6(04):5347.
  17. Shi R, Lewis RS, Panthee DR. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. **PLoS One.** 2018;13(12):1–14.
  18. Preuner S, Danzer M, Pröll J, Pötschger U, Lawitschka A, Gabriel C, et al. High-quality DNA from fingernails for genetic analysis. **J Mol Diagnostics.** 2014;16(4):459–66.
  19. Mutiawati VK. Pemeriksaan Mikrobiologi Pada *Candida Albicans*. **J Kedokt Syiah Kuala.** 2016;16(1):53–63.
  20. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. **Kuwait Med J.** 2009;41(2):117–22.
  21. Dilhari A, Sampath A, Gunasekara C, Fernando N, Weerasekara D, Sissons C, et al. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. **AMB Express.** 2017;7(1).
  22. Lozančić M, Žunar B, Hrestak D, Lopandić K, Teparić R, Mrša V. Systematic comparison of cell wall-related proteins of different yeasts. **J Fungi.** 2021;7(2):1–19.
  23. da Silva GA, Bernardi TL, Schaker PDC, Menegotto M, Valente P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. **Brazilian Arch Biol Technol.** 2012;55(2):319–27.
  24. Sari septi kurniama, Mazieda muthia naila, Listyorini D, Sulasmi eko sri. Optimization Of Dna Isolation And Purification Technique From Chili Pepper ( *Capsicum frutescens* ) Using Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid. **Semin Nas XI Pendidik Biol FKIP UNS.** 2014;65–70.
  25. Corporation P. Wizard® SV Genomic DNA Purification System. 2012;
  26. Fitriya RT, Ibrahim M, Lisdiana L. Keefektifan Metode Isolasi DNA Kit dan CTAB/NaCl yang Dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. **LenteraBio.** 2015;4(1):87–92.
  27. Kumalasari RD, Risandiansyah R, Fadli Z, Kumalasari RD, Risandiansyah R, Fadli Z. Perbandingan Metode Isolasi DNA Filter Based Kit dengan Heat Treatment Berdasarkan Limit of Detection dan Quantification pada *Staphylococcus aureus* Comparison DNA Isolation Method Filter Based Kit with Heat Treatment Based on Limit of Detection and Quanti. **J Kedokt Komunitas.** 2020;8(2):101–7.
  28. Rodriguez B V., Malczewskyj ET, Cabiya JM, Lewis LK, Maeder C. Identification of RNase-resistant RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* extracts: Separation from chromosomal DNA by selective

- precipitation. **Anal Biochem.** 2016;492:69–75.
29. Setiawati AA, Rohmad Barokah G, Alsere Bardian Sahaba M, Dini Arbajayanti R, Fabella N, Mustika Pertiwi R, et al. Perbandingan Metode Isolasi DNA pada Produk Perikanan Segar dan Olahan. **J Pengolah Has Perikan Indones.** 2020;23(3):447–58.
  30. Feliciello I, Chinali G. A Modified Alkaline Lysis Method for the Preparation of Highly Purified Plasmid DNA from *Escherichia Coli*. **Anal Biochem.** 1993;212(2):394–401.
  31. Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Saral R, Burns WH. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. **Infect Immun.** 1982;37(2):833–6.
  32. Hewajuli DA, Dharmayanti N. The Advance of Technology of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in Identifying the Genome of Avian Influenza and Newcastle Diseases. **Indones Bull Anim Vet Sci.** 2014;24(1):16–29.
  33. Lee D-Y, Seo Y-S, Kang S-G, Yoo H. Evaluation and modification of alkaline lysis plasmid preparation method from *Lactobacillus* spp. **Korean J Vet Res 대한수의학회지**. 2007;47(2):157–62.
  34. Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, Wilks M, Millar MR, Agrawal SG. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. **J Med Microbiol.** 2006;55(9):1187–91.
  35. Delaney S, Murphy R, Walsh F. A comparison of methods for the extraction of plasmids capable of conferring antibiotic resistance in a human pathogen from complex broiler cecal samples. **Front Microbiol.** 2018;9(AUG).